



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

PRIORITY DOCUMENT

REC'D 05 OCT 1998

W.P.O. PCT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 04 SEP. 1998

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



N° 55 -1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE	
DATE DE REMISE DES PIÈCES 18 JUL 1997		CABINET REGIMBEAU 26, Avenue Kléber 75116 PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 97 09152 -		n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone	
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75		236554 D17059 JW 01 45 00 92 02	
DATE DE DÉPÔT 18 JUL 1997		date	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle			
<input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire			
<input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen			
<input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°			
demande initiale			
Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat			
Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non			
Titre de l'invention (200 caractères maximum)			
Composition antitumorale à base de polypeptide immunogène de localisation cellulaire modifiée			
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN		code APE-NAF	
Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination		Forme juridique	
TRANSCENE S.A.		SOCIÉTÉ ANONYME	
Nationalité (s) Française		Pays	
Adresse (s) complète (s)		FR	
11, rue de Molsheim 67000 STRASBOURG			
En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>			
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE			
pays d'origine		numéro	
		date de dépôt	
		nature de la demande	
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire, n° d'inscription)		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 09152

TITRE DE L'INVENTION : Composition antitumorale à base de polypeptide immunogène de localisation cellulaire modifiée

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

TRANSGENE S.A.
11, rue de Molsheim 67000 STRASBOURG

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

KIENY Marie-Paule
6, allée des Platanes
67100 Strasbourg, FR

BALLOUL Jean-Marc
12, rue des Alouettes
67380 Lingolsheim, FR

BIZOUARNE Nadine
5, rue de Mutzig
67300 Schiltigheim, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur(s) ou du mandataire

1 septembre 1993

CABINET REGIMBEAU

ORIGINAL

1

Composition antitumorale à base de polypeptide immunogène de localisation cellulaire modifiée

La présente invention a pour objet une composition antitumorale comprenant à titre
5 d'agent thérapeutique ou prophylactique un polypeptide immunogène modifié de manière à présenter une localisation cellulaire différente de sa localisation native. Elle concerne également une composition à base de vecteur recombinant exprimant ledit polypeptide. Une telle composition est plus particulièrement destinée au traitement ou la prévention des lésions associées aux papillomavirus.

10 Il est généralement admis que le cancer est une maladie qui résulte d'une perte du contrôle de la multiplication cellulaire. Ses causes peuvent être multiples et dues notamment à un dysfonctionnement de gènes cellulaires (activation par exemple par mutation somatique de gènes potentiellement oncogènes ; dérégulation de l'expression ; inhibition de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs) ou à l'expression indésirable
15 de gènes viraux.

Chez l'homme, les papillomavirus (HPV) sont associés à des pathologies allant de l'infection bénigne de la peau, aux verrues et aux tumeurs malignes. Parmi les 75 types de HPV identifiés jusqu'à présent, 20 isolats distincts sont hautement spécifiques des voies
20 génitales et 5 d'entre eux (HPV-16 et 18 et à un moindre degré les HPV-31, 33 et 45) sont clairement associés au cancer du col de l'utérus et des voies basses. Toute une série d'études démontre le rôle transformant de ces virus, leur intégration spécifique dans le génome des cellules néoplasiques, leur activité génique dans les cellules cancéreuses et l'importance de l'expression de certains gènes viraux dans le maintien du phénotype malin des cellules néoplasiques HPV positives (Monsenego, J. Impact Medecin, 11 mars 1994).

25 D'une manière générale, les papillomavirus sont des virus à ADN possédant un génome circulaire d'environ 7900 paires de bases entouré par une capside protéique. Un certain nombre de types de papillomavirus, notamment bovins (BPV) et humains (HPV) ont été identifiés (Pfister, 1987, in *The papovaviridae : The Papillomaviruses*, édition Salzman et Howley, Plenum Press, New York, p 1-38). Leur génome comprend une région
30 précoce contenant les cadres de lecture E1, E2, E4, E5, E6 et E7 et une région tardive codant pour les protéines de capside L1 et L2.

Les protéines précoces ont la capacité de lier l'ADN et sont trouvées de manière prédominante dans le noyau. Les produits d'expression E1 et E2 régulent la réplication virale et l'expression des gènes viraux alors que ceux des régions E5, E6 et E7 sont

35

impliqués dans les processus de transformation oncogénique des cellules infectées. A cet égard, il a été montré expérimentalement que la protéine E5 de BPV-1 peut *in vitro* transformer des cellules (Schlegel et al., 1986, Science 233, 464-467). Le pouvoir transformant de E7 a été démontré pour HPV-16 et HPV-18 (Kanda et al., 1988, J. Virol. 62, 610-613 ; Vousden et al., 1988, Oncogene Res. 3, 1-9 ; Bedell et al., 1987, J. Virol. 61, 3635-3640) et corrélé à sa capacité à lier le produit du gène du rétinoblastome (Rb) (Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105 ; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446). Par ailleurs, Crook et al. (1991, Cell 67, 547-556) ont montré que l'antigène E6 de HPV-16 et 18 peut complexer le produit du gène p53, ce qui explique son rôle prédominant dans la transformation cellulaire.

Les pathologies associées aux virus HPV posent un problème thérapeutique du fait de leur nature persistante et récurrente. Même si les approches classiques demeurent la chirurgie et la chimiothérapie, l'immunothérapie est maintenant envisagée pour le traitement de ces maladies. Le candidat vaccin idéal doit, à titre préventif (immunoprophylaxie), empêcher l'infection de s'établir durablement et de se propager aux tissus voisins et, à titre curatif (immunothérapie), réduire l'évolution tumorale chez les patientes infectées. On a proposé jusqu'à présent d'utiliser les antigènes de capsid pour induire la production d'anticorps contre les épitopes localisés à la surface des particules virales et les protéines précoces pour établir l'immunité cellulaire à l'encontre des cellules infectées après intégration de l'ADN viral.

A cet égard, le brevet européen EP 0 462 187 décrit une approche thérapeutique par administration de poxvirus exprimant les gènes précoces des papillomavirus. L'approche de vaccination décrite dans WO 93/02184 est basée sur l'utilisation des antigènes de capsid à titre d'agents immunogènes et notamment de particules virales vides d'ADN (VLP pour Virus like particles) reconstituées *in vitro*. La demande française 96 09584 divulgue une composition associant l'effet préventif procuré par les polypeptides précoces et l'effet curatif conféré par les polypeptides tardifs des papillomavirus. Or, jusqu'à présent, on a mis en oeuvre les protéines virales, éventuellement mutées de manière à abolir leur activité transformante, mais néanmoins natives du point de vue de leur localisation cellulaire.

La présente invention se propose d'utiliser des protéines immunogènes dont la localisation cellulaire a été modifiée dans le but d'améliorer leur accessibilité au système

immun de l'hôte, afin d'améliorer ou stimuler une réponse immunitaire à l'égard de la tumeur ou du cancer à traiter, que celle-ci soit spécifique ou non spécifique et de type humoral (production d'anticorps) ou cellulaire (réponse cytotoxique CTL).

On a maintenant modifié les antigènes nucléaires E6 et E7 de HPV-16 par introduction de séquences d'ancrage et de sécrétion appropriées afin de leur conférer une présentation transmembranaire. Le changement de localisation a un effet bénéfique sur la réponse immune qui se traduit par une activité antitumorale supérieure chez les animaux traités avec un virus de la vaccine co-exprimant les antigènes E6 et E7 membranaires et l'IL-2 humaine, comparé à ceux ayant reçu un virus équivalent produisant les antigènes nucléaires. Le but de la présente invention est de mettre à la disposition du public des compositions antitumorales plus efficaces que les compositions de l'art antérieur, pour inhiber au moins partiellement l'établissement ou la progression d'une tumeur ou d'un cancer. Une application particulièrement utile est le traitement des infections à HPV et plus particulièrement des pathologies graves telles que le cancer du col de l'utérus.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet une composition antitumorale comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un ou plusieurs polypeptide(s) immunogène(s), l'un au moins desdits polypeptides étant modifié de manière à présenter une localisation différente de sa localisation native.

Au sens de la présente invention, le terme "polypeptide immunogène" désigne un polypeptide qui ne trouve pas son équivalent dans les cellules normales. Un exemple préféré est constitué par un antigène tumeur-spécifique. Pour illustrer, on peut citer les antigènes cellulaires dont l'expression survient pendant la période foeto-embryonnaire et régresse à la naissance jusqu'à disparaître, les antigènes qui s'expriment normalement à un très faible niveau et qui, exprimés à fort niveau, deviennent caractéristiques d'une tumeur, les antigènes cellulaires dont la structure ou la conformation est modifiée ou encore les antigènes non cellulaires, en particulier viraux dérivant d'un virus oncogène. Il peut s'agir par exemple des produits d'expression des gènes BRCA-1 (Miki et al., 1994, Science 226, 66-71), BRCA-2 (Wooster et al., 1995, Nature 378, 789-792), MUC-1 (Hareuveni et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9498-9502), CEA..., dont certaines mutations ou la surexpression sont impliquées dans le développement cancéreux. pour ce qui est des antigènes viraux, on peut citer plus particulièrement les produits d'expression des gènes précoces ou tardifs des papillomavirus, EBNA-1 du virus Epstein Barr, les antigènes des

virus HTLV (Human T Lymphocyte Virus) I et II, ou des virus de l'hépatite B et C. Les antigènes spécifiques de tumeurs sont largement décrits dans la littérature accessible à l'homme de l'art

La caractéristique essentielle du polypeptide en usage dans la présente invention est de présenter une localisation différente de sa localisation native. Les mécanismes de transport et les signaux impliqués sont décrits dans les ouvrages de biologie cellulaire (voir par exemple *Molecular Biology of the Cell*, Third Ed. Garland Publishing Inc. NY & London). Brièvement, la grande majorité des polypeptides est synthétisée sur des ribosomes libres dans le cytosol où ils exercent leur activité. Mais, certains polypeptides ont une destination cellulaire autre, généralement déterminée par la présence de signaux peptidiques appropriés et doivent être transportés jusqu'à celle-ci. Ainsi, les polypeptides destinés à être exportés vers la membrane plasmique ou sécrétés à l'extérieur de la cellule sont synthétisés par des ribosomes associés au réticulum endoplasmique (RE) généralement sous forme de précurseurs comportant à leur extrémité amino-terminale une séquence de sécrétion (ou peptide signal) qui initie leur passage dans le RE. Elle est ensuite éliminée par une endopeptidase spécifique pour donner le polypeptide mature. Une séquence de sécrétion comporte habituellement 15 à 35 acides aminés essentiellement hydrophobes. Il n'existe pas de séquence consensuelle et il semble que ce soit la structure secondaire qui détermine la reconnaissance par l'endopeptidase. Néanmoins, le clivage protéolytique a lieu le plus souvent après un résidu glycine, sérine ou alanine.

Les protéines membranaires comportent généralement une séquence d'ancrage de nature fortement hydrophobe qui reste insérée dans la membrane plasmique. Le polypeptide peut être transmembranaire avec l'une de ses extrémités exposée à l'extérieur de la cellule, la séquence d'ancrage traversant la membrane et l'autre extrémité du côté cytosolique. Dans la plupart des cas, la chaîne polypeptidique imbriquée dans la double couche lipidique de la membrane a une conformation en hélice α (voir par exemple Branden et Tooze, 1991, dans *Introduction to Protein Structure* p 202-214, NY Garland).

Quant à la localisation nucléaire, elle peut être conférée par la présence d'une courte séquence dite de localisation nucléaire (NLS) composée principalement de résidus chargés positivement, tels que lysine et arginine. On peut citer à titre d'exemples les signaux de translocation nucléaire KRKKRK et RKRRKR présents dans les polypeptides L1 et L2 de HPV (Zhou et al., 1991, *Virology* 185, 625-632). Cependant, certains polypeptides

exerçant leur fonction au sein du noyau ne possèdent pas de séquence NLS typique. C'est le cas des antigènes E6 et E7 de papillomavirus.

Le polypeptide immunogène compris dans la composition selon l'invention peut résulter de l'introduction et/ou la délétion ou de l'inactivation de signaux de localisation appropriés au sein d'un polypeptide natif, d'un fragment de celui-ci, d'une chimère comportant des séquences d'origines différentes ou d'un variant (délétion, insertion et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés). De manière plus particulière, sa séquence en acides aminés présente un degré de similarité avec tout ou partie de la séquence du polypeptide natif dont il est issu supérieur à 70 %, avantageusement, supérieur à 80 % et, de préférence, supérieur à 90 %. Le degré de similarité peut être aisément calculé à l'aide d'un programme ordinateur approprié ou en alignant les séquences de manière à obtenir le degré maximal d'homologie et en comptabilisant le nombre de positions dans lesquelles les acides aminés des deux séquences se retrouvent à l'identique par rapport au nombre total de positions.

L'homme du métier connaît les signaux permettant le changement de présentation cellulaire d'un polypeptide. Dans le cas où l'on désire que le polypeptide immunogène soit sécrété, l'adjonction d'une séquence de sécretion à son extrémité amino-terminale, permettra son transport via le RE vers l'extérieur de la cellule hôte. L'insertion a lieu de préférence immédiatement en aval du codon initiateur de la traduction. Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux de muter/déléter tout ou partie des résidus déterminant la localisation native, pour éviter les interférences. Par exemple, si le polypeptide natif a une destination membranaire, il comporte d'ores et déjà une séquence de sécretion et on procédera à la mutation ou délétion de la séquence d'ancrage hydrophobe.

Avantageusement, une composition selon l'invention comprend un polypeptide immunogène ayant naturellement une localisation non membranaire, notamment nucléaire, modifié de manière à présenter une localisation membranaire, de préférence, par insertion d'une séquence d'ancrage membranaire et, dans le cas où le polypeptide natif en est dépourvu, d'une séquence de sécretion. Le site d'insertion préféré de la séquence de sécretion est l'extrémité N-terminale, comme indiqué précédemment, et celui de la séquence d'ancrage membranaire est l'extrémité C-terminale, par exemple immédiatement en amont du codon stop. Dans ce contexte, il peut également être avantageux de procéder

à la mutation/déletion de tout ou partie des signaux de localisation natifs (par exemple séquence NLS) pour ne pas interférer avec la nouvelle localisation.

Le choix du signal de localisation susceptible d'être mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention est vaste. Il peut dériver de toute protéine en comportant d'origine eucaryote ou non (virus, parasite, champignon ...) du moment qu'il soit reconnu par la cellule à traiter. Il peut être naturel ou synthétique, hétérologue ou homologue vis à vis de cette dernière. Il peut également comporter une ou plusieurs modifications par rapport au signal dont il dérive, sous réserve qu'elles n'affectent pas sa fonction. A titre indicatif, on préférera avoir recours aux séquences de sécrétion et/ou d'ancrage membranaire de la glycoprotéine rabique, de la glycoprotéine env du virus HIV ou de la protéine F du virus de la rougeole. Dans le cas où la modification du polypeptide immunogène fait intervenir plusieurs signaux de localisation (par exemple séquence de sécrétion et d'ancrage membranaire), ceux-ci peuvent avoir une origine commune ou différente.

Par ailleurs, la modification de la localisation cellulaire peut être réalisée par toute technique conventionnelle, notamment par mutagenèse dirigée, ligation de signaux exogènes ou PCR.

Selon un mode de réalisation préféré, une composition antitumorale selon l'invention, est destinée à traiter ou prévenir les infections à papillomavirus et, en particulier le cancer du col de l'utérus. Selon ce mode de réalisation, elle comprend au moins un polypeptide immunogène originaire d'une région précoce et/ou tardive d'un papillomavirus, notamment d'un virus à risque tel que HPV-16, 18, 31, 33 ou encore 45.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, on peut mettre en oeuvre un ou plusieurs polypeptides immunogènes de papillomavirus quels qu'ils soient. Comme rappelé précédemment, leur génome code pour 8 polypeptides, deux polypeptides tardifs L1 et L2 composant la capside virale et 6 polypeptides précoces (E1, E2, E4, E5, E6 et E7) impliqués dans la régulation, le maintien du génome viral et la transformation des cellules infectées.

S'agissant d'un polypeptide immunogène de type précoce, on choisit avantageusement de mettre en oeuvre un polypeptide dérivant de E6 ou de E7, modifié notamment de manière à présenter une localisation membranaire. Etant donné les observations rappelées plus haut sur le pouvoir transformant, on a de préférence recours à un variant non oncogène muté au niveau de la région impliquée dans le processus de

transformation cellulaire. De tels variants sont décrits dans la littérature (Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105 ; Crook et al., 1991, Cell 67, 547-556 ; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446 ; Phelps et al., 1992, J. Virol. 66, 2418-2427). Un polypeptide immunogène convenant particulièrement aux fins de la présente invention, est l'antigène E6 de HPV-16 délété des résidus 111 à 115 (+1, représentant le premier acide aminé de l'antigène viral natif) et fusionné aux signaux de sécrétion et d'ancrage de la protéine F du virus de la rougeole (SEQ ID NO: 1). On peut également utiliser l'antigène E7 de HPV-16 délété des résidus 22 à 25 et fusionné aux séquences d'ancrage et de sécrétion de la glycoprotéine rabique (SEQ ID NO: 2).

La composition antitumorale selon l'invention peut également comprendre un polypeptide immunogène originaire de la région tardive d'un papillomavirus, dérivant de L1 ou L2.

Bien entendu, la composition antitumorale selon l'invention peut comprendre plusieurs polypeptides immunogènes, dont l'un au moins présente une localisation cellulaire différente de sa localisation native. On peut citer pour illustrer une composition associant plusieurs polypeptides dérivés de papillomavirus, ceux-ci pouvant avoir une origine commune ou différente (par exemple HPV-16 et 18 dans le but d'élargir le spectre d'action). Une composition combinant plusieurs polypeptides d'origine précoce permettra d'améliorer l'effet thérapeutique. La combinaison des polypeptides dérivés de L1 et L2 pourrait avoir un effet bénéfique sur les propriétés préventives de la composition. Enfin, une composition qui convient tout particulièrement aux buts poursuivis par la présente invention comprend au moins un polypeptide précoce et au moins un polypeptide tardif de papillomavirus afin de combiner l'effet préventif et curatif. Selon un mode préféré, l'un au moins des polypeptides immunogènes d'origine précoce est modifié de manière à présenter une localisation membranaire par adjonction de séquences de sécrétion et d'ancrage telles que celles citées auparavant.

A cet égard, une composition préférée selon l'invention comprend :

- (1) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1,
- (2) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- (3) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1 et un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,

- (4) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus,
- 5 (5) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus, ou
- 10 (6) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus.

15 Avantageusement, une composition antitumorale selon l'invention peut comprendre en outre au moins un composé améliorant son effet antitumoral, dans le but d'augmenter l'intensité de la réponse immunitaire spécifiquement ou non. Outre les adjuvants, les immunostimulateurs représentent des composés particulièrement préférés. Par "immunostimulateur", on entend un composé ayant la capacité de renforcer une réponse

20 immunitaire humorale afin d'amplifier la production d'anticorps dirigés contre le polypeptide immunogène ou à médiation cellulaire, afin de déclencher une réponse cytotoxique significative à l'encontre des cellules tumorales. A titre indicatif, l'immunostimulation peut être évaluée en modèle animal par comparaison du taux de rejet dans un animal auquel on a greffé une tumeur exprimant le polypeptide immunogène, ceci

25 en présence et en absence de l'immunostimulateur. D'une manière plus générale, les moyens pour mettre en évidence une immunostimulation sont indiqués dans Roitt (*Immunology*, 4th edition, Moby Ltd). Un des avantages d'une telle composition est qu'elle combine l'immunité spécifique induite par le polypeptide immunogène et l'immunité aspécifique induite par la molécule immunostimulatrice.

30 Dans le cadre de la présente invention, on peut utiliser un immunostimulateur natif, notamment d'origine humaine, une partie de celui-ci, une chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses ou encore un mutant, à la condition toutefois de conserver

la fonction immunostimulatrice. Parmi toutes les molécules envisageables, on préférera mettre en oeuvre un immunostimulateur choisi parmi l'interleukine-2, l'interleukine-7, l'interleukine-12 et les molécules de co-adhésion B7.1 et B7.2. On indique que l'interleukine-2 et la molécule B7.1 sont particulièrement préférées.

5 D'une manière générale, les polypeptides immunogènes et immunostimulateurs peuvent être produits par les méthodes conventionnelles de synthèse chimique ou bien par les techniques de l'ADN recombinant (voir par exemple Maniatis et al., 1989, *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Plus particulièrement, un procédé de préparation comprend l'acte de cultiver une cellule transformée par un fragment d'ADN codant pour le polypeptide en question pour générer
10 une cellule productrice et l'acte de récolter ledit polypeptide à partir de la culture. La cellule productrice peut être d'une origine quelconque et sans limitation, une bactérie, une levure ou bien une cellule de mammifère, dans la mesure où le fragment d'ADN considéré est soit intégré dans son génome soit intégré dans un vecteur d'expression approprié. Bien
15 entendu, le fragment d'ADN est placé sous le contrôle de signaux de transcription et de traduction permettant son expression dans la cellule productrice. Vecteurs d'expression et signaux de contrôle sont connus de l'homme du métier.

La présente invention vise également une composition antitumorale comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique au moins un vecteur recombinant comprenant
20 les séquences codant pour un ou plusieurs polypeptides immunogènes, l'un au moins desdits polypeptides étant modifié de manière à présenter une localisation différente de sa localisation native et, éventuellement, pour un composé améliorant l'effet antitumoral. Ce type de composition présente l'avantage d'une production bon marché et d'une grande stabilité dans des conditions d'environnement variées. En particulier, les conditions de
25 conservation sont moins contraignantes. Les polypeptides ont les caractéristiques telles que définies ci-avant.

Les séquences codant pour le polypeptide immunogène ou améliorant l'effet antitumoral peuvent être obtenues par clonage, par PCR (Polymerase Chain Réaction) ou par synthèse chimique selon les techniques conventionnelles communément en usage et à
30 partir des données de la littérature. Pour ce qui est du mode de réalisation préféré, les séquences codant pour les polypeptides de papillomavirus peuvent être isolées à partir de cellules papillomavirus positives obtenues de patients ou de collections. L'insertion des

signaux de localisation appropriés peut être réalisée par les techniques de biologie moléculaire. Les séquences codant pour l'immunostimulateur peuvent être clonées à partir de l'ADN cellulaire ou des ARN messagers d'une cellule dans laquelle il est exprimé. L'homme du métier est capable de générer les sondes ou amorces appropriées à partir des données publiées. On indique que la séquence nucléotidique des génomes HPV-16 et 18 est divulguée dans Genbank aux numéros d'accès K02718 et X05015 respectivement. La séquence du gène humain IL-2 est décrite dans le brevet français 85 09480 et dans Taniguchi et al. (1983, *Nature* 302, 305-311) et celle codant pour l'antigène B7.1 dans Freeman et al., 1989, *J. of Immunology* 143, 2714-2722).

Un vecteur utilisable dans le cadre de l'invention peut être plasmidique ou viral, dérivé notamment d'un poxvirus, d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus de l'herpès ou d'un virus associé à l'adénovirus. Avantageusement, il s'agira d'un vecteur non-intégratif et d'une virulence atténuée. De tels vecteurs ainsi que leurs techniques de préparation sont connus de l'homme de l'art.

Dans le cas où l'on met en oeuvre un vecteur adénoviral, on aura de préférence recours à un vecteur non replicatif par délétion de régions essentielles à la replication et, notamment, de la majorité de la région E1 afin d'éviter sa propagation au sein de l'organisme hôte ou l'environnement. Il va de soi que l'on peut modifier ou déléter d'autres régions du génome adénoviral, dans la mesure où les fonctions essentielles déficientes sont complétées en *trans*. Un vecteur adénoviral préféré selon l'invention retiendra au minimum les séquences essentielles à l'encapsulation, à savoir les ITRs (Inverted Terminal Repeat) 5' et 3' et la région d'encapsulation. Les différents vecteurs adénoviraux ainsi que leurs techniques de préparation sont conventionnels et sont décrits dans Graham et Prevec (1991, in *Methods in Molecular Biology*, vol 7, p 109-128 ; Ed : E.J. Murey, The Human Press Inc.) et dans la demande internationale WO 94/28152. S'il s'agit d'un rétrovirus, on conserve les LTRs (Long Terminal Repeat) et les séquences d'encapsulation (voir par exemple Naviaux et Verma, 1992, *Current Opinion in Biotechnology* 3, 540-547).

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur recombinant selon l'invention dérive d'un poxvirus et, notamment, d'un poxvirus aviaire, tel que le poxvirus du canari, d'un fowlpox ou d'un virus de la vaccine, ce dernier étant préféré. Parmi tous les virus de la vaccine envisageables dans le cadre de la présente invention, on choisit de préférence les souches Copenhagen, Wyeth et Ankara modifiée (MVA pour Modified Vaccinia Virus

Ankara). Les conditions générales d'obtention d'un virus de la vaccine capable d'exprimer un gène hétérologue sont enseignées dans le brevet européen EP 83 286 et la demande EP 206 920. Quant au virus MVA, il est plus particulièrement décrit dans Mayr et al. (1975, Infection 3, 6-14) et Sutter et Moss (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10847-10851).

5 Bien entendu, dans le cadre de la présente invention, les séquences codant pour le polypeptide immunogène ou améliorant l'effet antitumoral sont placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte. Ceux-ci incluent les éléments de régulation de la transcription ainsi que des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction. Parmi eux, le promoteur revêt une importance particulière.

10 D'une façon générale, on aura recours à un promoteur fonctionnel dans l'organisme ou la cellule hôte que l'on veut traiter et adapté au vecteur employé. En outre, il peut être modifié de manière à contenir des séquences régulatrices, par exemple un élément activateur de la transcription ou des séquences répondant à certains signaux cellulaires. A cet égard, il peut être avantageux d'utiliser un promoteur tissu-spécifique puisque les

15 lésions associées aux papillomavirus sont localisées au niveau des voies génitales ou un promoteur répondant à des signaux spécifiquement tumoraux (par exemple activé en présence de facteurs de croissance généralement surexprimés par les cellules tumorales) afin de limiter l'expression aux seules cellules tumorales.

Parmi les promoteurs envisageables dans le cadre de l'invention, on peut citer les

20 promoteurs SV40 (Virus Simian 40), HMG (Hydroxy-Methyl-Glutaryl-coenzyme A), TK (Thymidine Kinase), CMV (cytomégalovirus), RSV (Rous Sarcoma Virus), MLP (Major Late Promoter) adaptés au vecteur adénoviraux et le LTR du Mo-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) plus spécifiques des vecteurs rétroviraux. S'agissant d'un vecteur poxviral, on aura de préférence recours au promoteur 7,5K, H5R, TK ou encore K1L du virus de

25 la vaccine. Les promoteurs en question sont décrits dans la littérature et peuvent être clonés à partir du génome cellulaire ou viral par les techniques classiques.

Par ailleurs, les éléments nécessaires à l'expression peuvent également comporter des séquences améliorant l'expression ou le maintien dans la cellule hôte (intron, séquence terminatrice de la transcription, site d'initiation de la traduction...). Cependant, dans le cas

30 d'un vecteur poxviral, on évitera l'emploi d'introns.

Une composition selon l'invention peut comprendre un seul ou plusieurs vecteurs recombinants exprimant les séquences correspondant aux polypeptides choisis placés, sous le contrôle d'éléments indépendants ou communs. Selon cette dernière option, on peut

avoir recours à des séquences permettant d'initier la traduction de manière interne (IRES) ou à des fusions en phase des différents gènes.

Les conditions générales d'obtention d'un vecteur recombinant en usage dans la présente invention sont largement décrits dans l'état de la technique. S'agissant d'un vecteur
 5 poxviral, on peut se référer au brevet européen EP 83 286 dont le contenu est ici incorporé par référence. Ces conditions sont applicables aux autres virus acceptables comme vecteur qui possèdent une région génomique non essentielle dans laquelle les blocs d'expression peuvent être incorporés. Bien entendu, ils peuvent être insérés dans le même locus ou un locus différent. A titre indicatif, lorsque l'on utilise un vecteur poxviral de la souche
 10 Copenhague, le site d'insertion préféré est le locus TK, ce qui a pour effet d'inactiver celui-ci et ainsi faciliter la sélection des recombinants. On peut également utiliser le locus K1L. Pour ce qui est d'un vecteur dérivé de la souche MVA, l'insertion des séquences recombinantes (immunogènes et immunostimulatrices) peut être réalisée au sein de l'une au moins des excisions I à VI et, notamment II ou III (Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol.
 15 72, 1031-1038 ; Sutter et al., 1994, Vaccine 12, 1032-1040).

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un vecteur recombinant peut en outre comprendre un bloc d'expression d'un gène marqueur de sélection afin de faciliter les étapes d'isolement et de purification du virus recombinant. On peut citer notamment le gène *neo* conférant la résistance à l'antibiotique G418, le gène *pac*
 20 de résistance à la puromycine, le gène TK du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) qui confère la sensibilité à certains analogues de nucléosides tels que le ganciclovir ou l'acyclovir, les gènes bactériens *LacZ* codant pour la β -galactosidase et *gus A* codant pour la β -glucuronidase. Ces deux derniers marqueurs enzymatiques permettent de repérer les virus recombinants par coloration en présence des substrats X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) et XglcA (5-bromo-6-chloro-3-indolyl- β -D-glucoronide)
 25 respectivement.

Une composition antitumorale préférée est destinée au traitement ou la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus, comprend au moins un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans lequel sont insérées :

- 30 (1) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1,
- (2) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID
 35 NO: 2,

- (3) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1 et pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- 5 (4) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus,
- 10 (5) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus, ou
- 15 (6) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus.
- 20

Ladite composition peut également comprendre les séquences codant pour un immunostimulateur de préférence choisi parmi L'IL-2 ou B7.1. Il peut être porté par l'un des vecteurs recombinants permettant l'expression du ou des gènes immunogènes ou par

25 un vecteur indépendant.

Une composition selon l'invention peut être préparée selon les procédés connus dans le domaine des vaccins et les doses applicables peuvent varier dans une large gamme. Elles sont fonctions notamment des polypeptides et du vecteur employés, de la pathologie à traiter, de l'état du patient et d'autres paramètres qui peuvent être évalués par le clinicien.

30 Cependant, en général, la dose de virus sera de 10^4 à 10^{13} , avantageusement de 10^6 à 10^{12} et, de préférence de 10^7 à 10^{10} unités formant des plages (ufp) lorsque l'agent thérapeutique est un vecteur viral et de 0,05 à 500 mg, avantageusement de 0,5 à 200 mg et, de préférence de 1 à 100 mg lorsque l'agent thérapeutique est d'origine polypeptidique.

Une composition selon l'invention peut être administrée selon n'importe quelle voie conventionnelle d'administration, en particulier par voie intramusculaire, intraveineuse, intrapulmonaire, sous-cutanée ou sous-épithéliale ou bien par scarification. Dans le cas d'une tumeur accessible, il est également possible de recourir à une injection directe dans le site ou à proximité de la tumeur ou à une application topicale. A titre de vaccin, une composition selon l'invention peut être administrée selon les pratiques courantes dans le domaine, par exemple en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Par contre dans le cadre d'un traitement curatif, elle peut être administrée fréquemment pendant une période suffisante pour que le traitement soit efficace. Lorsque l'agent thérapeutique est un vecteur viral, le virus est de préférence sous forme vivante. S'agissant d'un vecteur poxviral, on préférera employer une souche atténuée comme la souche MVA ou la souche Copenhague thymidine kinase négative. Enfin un vecteur viral recombinant peut être atténué par un traitement chimique approprié connu de l'homme du métier. Toutefois, on peut aussi envisager d'injecter un vecteur recombinant tué.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré, une composition antitumorale selon l'invention comprend une quantité thérapeutiquement efficace de l'agent thérapeutique en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Le support est choisi de manière à permettre son administration par injection à l'homme ou à l'animal. Elle peut également comprendre un véhicule, un diluant et/ou un adjuvant et se présenter sous forme liquide ou lyophilisée.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une composition antitumorale selon l'invention, pour la préparation d'un médicament pour le traitement ou la prévention du cancer ou de tumeurs et, en particulier du cancer du col de l'utérus, d'une dysplasie du col de bas grade ou d'une infection à papillomavirus.

Enfin, la présente invention a également trait à une méthode de traitement ou de prévention des pathologies citées ci-dessus, selon laquelle on administre à un individu ayant besoin d'un tel traitement une quantité efficace d'un point de vue pharmaceutique d'un polypeptide ou d'un vecteur recombinant en usage dans la présente invention.

30 EXEMPLES

La présente invention est plus complètement décrite, sans pour autant être limitée, à l'aide des exemples suivants.

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, *supra*) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. La mutagenèse dirigée *in vitro* par oligonucléotides synthétiques est effectuée à l'aide du kit distribué par Amersham. Les techniques d'amplification par PCR sont connues de l'homme de l'art (voir par exemple PCR Protocols-A guide to methods and applications, 1990, édité par Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow). En ce qui concerne les étapes de clonage, les bactériophages M13 recombinants sont multipliés sur la souche *E. coli* NM522 (Stratagène) dans un milieu minimum gélosé (agar 7,5 %) ou dans un milieu riche LBM liquide. Les plasmides recombinants portant le gène de résistance à l'ampicilline sont repliqués dans les souches *E. coli* C600 (Stratagène), BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580) et NM522 sur milieu gélosé ou liquide supplémenté de 100 µg/ml d'antibiotique. On utilise préférentiellement la souche BJ5183 lorsque le clonage est effectué par recombinaison homologue (Bubeck et al., 1993, Nucleic Acid Res. 21, 3601-3602).

La construction des virus de la vaccine recombinants est effectuée selon la technologie classique dans le domaine divulguée dans les documents déjà cités et dans Mackett et al., (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419) et Mackett et al. (1984, J. Virol. 49, 857-864).

EXEMPLE 1 : Construction des vecteurs portant les séquences codant pour les mutants non oncogènes de E6 et E7 de HPV-16 munis de signaux de localisation transmembranaire.

Les gènes E6 et E7 sont isolés à partir de la lignée cellulaire Caski comme décrit aux exemples 2 et 3 du brevet européen EP 0 462 187. Deux constructions ont été dérivées du clone M13E7/E6 contenant les gènes E6 et E7 du HPV-16 afin de faciliter les étapes ultérieures de clonage. La première désignée M13TG8188 résulte de l'introduction par mutagenèse dirigée de sites *Pst*I et *Bam*HI respectivement en amont et en aval du gène E7 et la seconde, M13TG8189 comporte un site *Pst*I en amont du gène E6. L'introduction de mutations ponctuelles en amont d'un ATG initiateur et en aval d'un codon stop sont à la portée de l'homme de l'art.

L'association de la protéine E7 de HPV-16 avec le produit du gène de rétinoblastome a été démontrée par divers auteurs (voir par exemple Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105) et corrélée à son pouvoir transformant. Pour des raisons évidentes de sécurité, on génère un mutant non oncogène délété des codons 21 à 26 de la protéine E7 native impliqués dans la fonction de transformation, par mutagenèse dirigée du vecteur M13TG8188 à l'aide de l'oligonucléotide oTG5118 (SEQ ID NO: 3). On obtient M13TG9104 portant le gène E7 muté, désigné ci-après E7*.

Les signaux de sécrétion et d'ancrage de la glycoprotéine rabique sont isolés du gène de la glycoprotéine rabique inséré sous forme d'un fragment *Bgl*II dans le pBR327 (pTG150 décrit dans le brevet français 83 15716) et sous cloné en vecteur M13 (M13TG177). On introduit entre ces signaux un site *Bam*HI en phase avec ces derniers par mutagenèse dirigée à l'aide de l'oligonucléotide oTG5745 (SEQ ID NO: 4). La construction résultante est dénommée M13TG9128. Les séquences de sécrétion et d'ancrage sont ensuite isolées du M13TG9128 par digestion *Pst*I et insérées en 3' du promoteur naturel du virus de la vaccine p7.5 dans le vecteur pTG5003 linéarisé par *Pst*I, pour donner pTG5016. A titre indicatif, pTG5003 dérive du pTG186poly (décrit dans le brevet français 2 583 429) par digestion *Sa*II, traitement par le fragment Klenow, puis digestion par *Sma*I et religation, de sorte qu'il ne contient plus dans son polylinker que les sites *Pst*I et *Eco*RI à l'exclusion de tout autre. Le vecteur M13TG9104 est modifié par mutagenèse dirigée à l'aide des oligonucléotides oTG6390 et oTG6880 (SEQ ID NO: 5 et 6) afin de mettre en phase les séquences E7* et les signaux de sécrétion et d'ancrage de la glycoprotéine rabique (désignées par la suite E7*TMR). La construction résultante est dénommée M13TG9150.

De même, il a été démontré que la protéine E6 de HPV-16 pouvait interagir avec le produit d'expression du gène suppresseur de tumeur *p53* (Crook et al., 1991, Cell 67, 547-556). Le domaine impliqué dans cette interaction a clairement été défini et se situe entre les résidus 111 à 115 de la protéine native. Le vecteur M13TG9125 est généré par mutagenèse de M13TG8189 à l'aide de l'oligonucléotide oTG5377 (SEQ ID NO: 7). Le gène E6 ~~111~~ 111-115 est désigné ci-après E6*.

Les signaux de sécrétion et d'ancrage de la protéine F du virus de la rougeole sont isolés par PCR à partir de la construction plasmidique pTG2148 (décrite dans le brevet européen EP 0 305 229) contenant l'ADN codant pour la protéine F du virus de la

rougeole. La fusion entre ces séquences et celles codant pour E6* est réalisée par PCR direct : la séquence de sécrétion est amplifiée à l'aide des oligonucléotides oTG10829 portant en 5' un site *Xba*I (SEQ ID NO: 8) et oTG10830 recouvrant l'extrémité 5' de E6 (SEQ ID NO: 9), les séquences codant pour le mutant E6* sont amplifiées à partir du
 5 M13TG9125 à l'aide des oligonucléotides oTG10835 permettant la fusion avec l'extrémité 3' du signal de sécrétion de la protéine F (SEQ ID NO: 10) et oTG10836 permettant la fusion avec l'extrémité 5' de la séquence d'ancrage de la protéine F (SEQ ID NO: 11). Pour la séquence d'ancrage, on met en oeuvre les amorces oTG10833 permettant la fusion entre le 3' de E6* et le 5' de la séquence d'ancrage (SEQ ID NO: 12) et oTG10834 créant
 10 en 3' les sites *Kpn*I et *Sph*I (SEQ ID NO: 13). Le fragment amplifié portant les séquences E6* fusionnées en N et C terminal respectivement aux séquences de sécrétion et d'ancrage membranaire de la protéine F (désignées par la suite E6*TMF) est digéré par *Xba*I et *Sph*I puis inséré aux mêmes sites dans le vecteur M13TG131 (Kieny et al., 1983, Gene 26, 91-99). La construction ainsi obtenue est appelée M13TG9199.

15
 EXEMPLE 2 : Construction du virus recombinant MVATG8042 exprimant les antigènes E6 et E7 de localisation transmembranaire et l'IL-2 humaine.

20 Le virus MVA dérive de la souche du virus de la vaccine Ankara. Il n'est pas capable de générer des particules infectieuses sur les cellules de mammifères mais se développe correctement sur des fibroblastes embryonnaires de poulet. Son adaptation à ces cellules a provoqué l'excision de 6 régions non essentielles pour son développement et son cycle infectieux sur ce type de cellules (disparition d'environ 15 % du génome viral ; Meyer
 25 et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038). L'intégration de matériel génétique exogène peut être réalisée au niveau de l'une quelconque de ces zones d'excision. Dans le cadre de la présente invention, on utilise les excisions II et III localisées au niveau des fragments de restriction *Hind*III N et A respectivement (Altenburger et al., 1989, Arch. Virol. 105, 15-27).

30 Dans un premier temps, on construit le vecteur pTG6019 permettant l'insertion dans la zone d'excision III du virus MVA. Les bras de recombinaison homologue de part et d'autre de la zone d'excision III sont isolés par PCR à partir du génome viral (voir brevet

américain US 5,185,146) et des amorces oTG7637 et oTG7638 (SEQ ID NO: 14 et 15) pour le bras gauche et oTG7635 et oTG7636 (SEQ ID NO: 16 et 17) pour le bras droit. Les fragments amplifiés sont clonés au site *EcoRI* du vecteur pTG1E, pour donner pTG6019. Le matériel génétique à transférer est inséré entre les deux bras de recombinaison. Le vecteur pTG1E est similaire au pTG1H (brevet français 2 583 429) mis à part la présence d'un adaptateur *EcoRI* à la place de sites multiples de clonage.

On insère en premier lieu une cassette d'expression du gène marqueur *gus A*. Le promoteur 7,5K est tout d'abord cloné dans le site *BamHI* de pTG6019. On obtient pTG6021 dans le site *BamHI* duquel on insère le gène *gus A* généré sous forme d'un fragment *BglII-BamHI*. Celui-ci peut être obtenu à partir de la séquence divulguée dans la littérature. La construction résultante est dénommée pTG6022. La présence du marqueur va permettre de discriminer les virus sauvages des virus recombinants par détection de l'activité enzymatique GUS par le substrat XglcA. Une coloration rouge révèle l'activité β -glucuronidase. Cependant, dans l'optique d'une application clinique, il peut être utile d'être en mesure d'éliminer ce marqueur bactérien du produit final après la sélection des virus recombinants. Pour ce faire, on met à profit la capacité de la vaccine à déléter les séquences comprises entre deux sites homologues. C'est pourquoi on insère un second promoteur p7,5K en aval du gène *gus A* dans une orientation sens par rapport à celui qui dirige l'expression de ce dernier. Le vecteur pTG6025 résulte de l'insertion entre les sites *BamHI* et *SacI* de pTG6022 d'un fragment p7,5K muni d'extrémités cohésives.

Par ailleurs, l'ADNc codant pour l'interleukine-2 humaine est isolé du plasmide pTG36 (brevet français 2 583 770) par digestion *PstI* et inséré dans le site *PstI* du plasmide pTG186 (brevet français 2 583 429), donnant lieu à pTG188. Le virus obtenu par recombinaison homologue est dénommé VVTG188. Après digestion *BglII/EcoRI*, les séquences IL-2 sont insérées en 3' du promoteur naturel de la vaccine pH5R aux sites *BamHI/EcoRI* du M13TG9132, pour donner M13TG9185. A titre indicatif, le vecteur M13TG9132 provient de l'insertion du promoteur du gène H5R isolé par PCR du génome viral dans le phage M13TG6131, lequel dérive de M13TG131 (Kieny et al., 1983, *supra*) par mutation du site *BglII* interne situé en dehors des sites multiples de clonage.

Les gènes HPV-16 et IL-2 sont ensuite clonés dans la zone d'excision III du génome du MVA. Les séquences E7**TMR* sont isolées par digestion *BglII/HindIII* et insérées entre les sites *BamHI* et *HindIII* du pTG6025 en 3' du promoteur vaccine p7.5.

La construction résultante est dénommée pTG6050. Un site d'insertion de la cassette d'expression du gène de l'IL-2 humaine par recombinaison homologue est créé entre les sites *HindIII* et *KpnI* du pTG6050 par insertion des oligonucléotides oTG10502 et oTG10503 (SEQ ID NO: 18 et 19). Le vecteur généré pTG6074 est ensuite linéarisé par digestion *HindIII/KpnI* et la recombinaison homologue avec la cassette d'expression pH5R-IL-2 isolée du M13TG9185 par digestion *BglII/EcoRI* est réalisée. La construction résultante pTG6088 est finalement linéarisée par *KpnI* et mis en ligation avec le gène E6*TMF isolé du M13TG9199 par digestion *KpnI/XbaI* et le promoteur p7.5 isolé du M13TG9136 par digestion *XbaI/KpnI*. La construction résultante est dénommée pTG8042.

Le vecteur M13TG9136 provient de M13TG5107 modifié par mutagenèse dirigée à l'aide des oTG5925 (création d'un site *PstI* en 3' du promoteur p7.5 ; SEQ ID NO: 20) et oTG5924 (création d'un site *BamHI* et *KpnI* en 5' du promoteur p7.5 ; SEQ ID NO: 21).

Le virus MVATG8042 est généré par recombinaison homologue avec le génome MVA selon les règles de l'art. L'isolement des recombinants est facilité par la présence du gène marqueur *gusA*.

EXEMPLE 3 : Efficacité in vivo du virus MVATG8042 (immunothérapie).

Des souris C57BL6 sont inoculées avec 10^3 cellules BMK-16 myc implantées en voie sous-cutanée. A titre indicatif, la lignée cellulaire dérive de cellules de rein de souris nouveau-nées transfectées par le génome HPV-16 et le gène c myc murin. 10^7 pfu (unités formant des plaques) de virus MVATG8042 sont ensuite administrés également en sous-cutanée à J3, J6 et J9 et l'évolution des tumeurs suivie régulièrement. Les souris traitées présentent un retard de la croissance tumorale jusqu'à J15 par rapport aux contrôles constitués par des animaux ayant reçu un virus MVA non recombinant. De plus, le traitement s'accompagne d'une régression partielle des tumeurs à J30-35 qui n'est pas observée lorsqu'on met en oeuvre un MVA équivalent exprimant les mutants E6* et E7* de localisation nucléaire native.

EXEMPLE 4 : Construction du virus recombinant VVTG5095 exprimant l'antigène E7* de localisation transmembranaire.

Les séquences E7*TMR sont isolées du M13TG9150 par digestion *BglII/BamHI* et insérées au site *BamHI* du pTG5016. La construction résultante, dénommée pTG5095,

contient les séquences E7* fusionnées aux signaux de sécrétion et d'ancrage de la glycoprotéine rabique, sous contrôle du promoteur p7.5. Le virus VVTG5095 est généré par recombinaison homologue avec le génome vaccine.

5 EXEMPLE 5 : Construction du virus recombinant VVTG6002 exprimant l'antigène E7* de localisation transmembranaire et l'immunostimulateur B7.1.

Le gène B7.1 humain est isolé à partir d'une lignée cellulaire humaine Daudi par PCR reverse (RT-PCR) à l'aide des amorces oTG6353 et oTG6352 (SEQ ID NO: 22 et 23) et inséré entre les sites *Bgl*II et *Eco*RI de M13TG6131. On obtient M13TG9149 dont on isole le fragment *Bgl*II-*Eco*RI lequel est sous cloné entre les mêmes sites de M13TG5107, en 3' du promoteur p7.5 (M13TG5107 porte les séquences promotrices p7.5 clonées dans le site *Bam*HI du M13TG130). La cassette p7.5-B7.1 est isolée de la construction ainsi obtenue dénommée M13TG9152 par digestion *Eco*RI/*Pst*I et introduite dans le site *Eco*RI de pTG5095 à l'aide de l'oTG1086 (5'AATTGCA3'). La construction résultante est dénommée pTG6002 et les virus recombinants VVTG6002 sont produits par recombinaison homologue avec le génome de la vaccine.

20 EXEMPLE 6 : Efficacité in vivo des virus VVTG5095 et VVTG6002 (immunoprophylaxie).

Des souris C57BL6 ont été vaccinées à trois reprises par voie sous-cutanée avec 10^7 pfu de VVTG5095 ou VVTG6002. Trois jours après la dernière immunisation, ces animaux sont éprouvés avec 10^3 cellules E7W1 implantées en sous-cutané. A titre indicatif, les cellules E7W1 proviennent d'une lignée de lymphome murin transfectée par un vecteur exprimant le gène E7 oncogène de HPV-16. Le pourcentage de survie des animaux en fonction du temps est comparé à celui obtenu avec des souris témoins traitées avec 10^7 pfu d'un virus de la vaccine non recombinant VVTG186 (dérivé du vecteur TG186 décrit ci-dessus). Le suivi de la mortalité montre une différence entre les trois groupes. Alors que dans le groupe témoin 100 % des animaux sont morts à J36, on observe la survie d'environ un quart des animaux vaccinés par VVTG5095. La protection est sensiblement améliorée avec la construction VVTG6002 qui inclut les séquences codant pour l'antigène B7.1.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Transgene SA
- (B) RUE: 11 rue de Molsheim
- (C) VILLE: Strasbourg
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 67082
- (G) TELEPHONE: (33) 03 88 27 91 00
- (H) TELECOPIE: (33) 03 88 27 91 11

(ii) TITRE DE L' INVENTION: composition antitumorale a base de polypeptide immunogene de localisation cellulaire modifiee.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 23

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 243 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Human papillomavirus
- (B) SOUCHE: HPV-16
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: proteine E6 fusionnee signaux de la proteine F

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

- (B) CLONE: E6*TMF

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Met	Gly	Leu	Lys	Val	Asn	Val	Ser	Ala	Ile	Phe	Met	Ala	Val	Leu	Leu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Gln	Thr	Pro	Thr	Gly	Gln	Ile	His	Trp	Gly	Met	His	Gln	Lys
			20					25					30		
Arg	Thr	Ala	Met	Phe	Gln	Asp	Pro	Gln	Glu	Arg	Pro	Arg	Lys	Leu	Pro
			35				40					45			

Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu
 50 55 60
 Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe
 65 70 75 80
 Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala
 85 90 95
 Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg
 100 105 110
 His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn
 115 120 125
 Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro
 130 135 140
 Leu Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly
 145 150 155 160
 Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg
 165 170 175
 Arg Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ser Ser Thr Ser Ile Val Tyr Ile Leu
 180 185 190
 Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly Ile Pro Ala Leu Ile Cys
 195 200 205
 Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys Gly Glu Gln Val Gly Met Ser
 210 215 220
 Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ser Lys Ser Tyr Val
 225 230 235 240
 Arg Ser Leu

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 185 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: human Papillomavirus
- (B) SOUCHE: HPV-16
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: E7 fusionne signaux de la glycoprotéine rabique

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

- (B) CLONE: E7*TMR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Gly Ser Met His Gly Asp Thr Pro Thr
 20 25 30

Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Gln Leu Asn
 35 40 45

Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala
 50 55 60

Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys
 65 70 75 80

Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg
 85 90 95

Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile
 100 105 110

Cys Ser Gln Lys Pro Arg Ser Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu
 115 120 125

Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val
 130 135 140

Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu
 145 150 155 160

Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser
 165 170 175

His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu
 180 185

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Human Papillomavirus
- (B) SOUCHE: HPV-16
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG5118
 (E7 delete 21 26)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TCTGAGCTGT CATTTAATTG AGTTGTCTCT GGTTC

36

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Rabies virus
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese
otG5745

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TGCACTCAGT AATACATAGG ATCCAATAGG GAATTTCCTT AA

42

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese otG6390

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GTATCTCCAT GCATGGATCC TGCAGGGTTT CTCTACGT

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG6880

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GGATCCGCCA TGGTAGATCT TGGTTTCTGA GAACAG

36

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Rabies virus
 - (B) SOUCHE: HPV-16
 - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG5377
(E6 delete 111 a 115)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

TGTCCAGATG TCTTTGCAGT GGCTTTTGAC AG

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (B) SOUCHE: oligonucleotide de synthese oTG10829

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GCGCGCTCTA GAATTATGGG TCTCAAGGTG AACG

34

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (B) SOUCHE: oligonucleotide de synthese oTG10830

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CAGTTCTCTT TTGGTGCATG CCCCAATGGA TTTGA

35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (B) SOUCHE: oligonucleotide de synthese oTG10835

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

ATGCTAGTGC TCGATAAACC CAGCTGGGTT TCTCTACG

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:
 - (B) SOUCHE: oligonucleotide de synthese oTG10836

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

TCAAATCCAT TGGGGCATGC ACCAAAAGAG AACTG

35

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:
 - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10833

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CGTAGAGAAA CCCAGCTGGG TTTATCGAGC ACTAGCAT

38

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:
 - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10834

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GCGGGCATGC GGTACCTCAG AGCGACCTTA CATAGG

36

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Vaccinia virus
 - (B) SOUCHE: Ankara modifie
 - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7637
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GGGGGGGAAT TCAGTAAACT TGAATAATC TT

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Vaccinia virus
 - (B) SOUCHE: Ankara modifie
 - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7638
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

GGGGGGGGAT CCGAGCTCAC CAGCCACCGA AAGAGCAAT

39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Vaccinia virus

- (B) SOUCHE: Ankara modifie
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7635
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

GGGGGGGGAT CCGGAAAGTT TTATAGGTAG TT

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Vaccinia virus
 - (B) SOUCHE: Ankara modifie
 - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7636
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

GGGGGGGAAT TCTTTGTATT TACGTGAACG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 77 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (B) SOUCHE: oligonucleotide de synthese oTG10502

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

AGCTTTTTTAT TCTATACTTA AAAAATGAAA ATAAACTCGA GTTGTCAAAG CATCATCTCA

60

ACACTGACTT GAGGTAC

77

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 69 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
 (B) SOUCHE: oligonucleotide de synthese oTG10503

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

CTCAAGTCAG TGTGAGATG ATGCTTTGAC AACTCGAGTT TATTTTCATT TTTAAGTAT 60
 AGAATAAAA 69

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG5925

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

TCAGATCTGT CGAGGGATCT GCAGCTTCTT CTAGAGGTA 39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 44 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG5924

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

AGTGAATTGC TGCAGGTACC CGGATCCGCA TCGACTATCG ACAT

44

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (B) SOUCHE: lignee cellulaire Daudi
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: amorce PCR oTG6353 (clonage B7.1)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

TCAGCCCCTG AATTCTGCGG ACACTGTTAT ACAGG

35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (B) SOUCHE: lignee cellulaire Daudi
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: amorce PCR oTG6352 (clonage B7.1)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

TTGACCCTAA AGATCTGAAG CCATGGGCCA CAC

33

Revendications

1. Composition antitumorale comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un ou plusieurs polypeptide(s) immunogène(s), caractérisée en ce que l'un au moins desdits polypeptides est modifié de manière à présenter une localisation différente de sa localisation native.
5
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la modification du polypeptide est obtenue par l'introduction de signaux de localisation appropriés et/ou la délétion ou l'inactivation des signaux de localisation natifs.
10
3. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 ou 2, dans laquelle le polypeptide immunogène ayant naturellement une localisation non membranaire, notamment nucléaire, est modifié de manière à présenter une localisation membranaire.
15
4. Composition antitumorale selon la revendication 3, dans laquelle le polypeptide immunogène est modifié par insertion d'une séquence d'ancrage membranaire et, le cas échéant, d'une séquence de sécrétion.
20
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le polypeptide est déléte de sa séquence de localisation nucléaire.
6. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 et 4, dans laquelle la séquence de sécrétion et/ou d'ancrage membranaire est sélectionnée parmi le groupe constitué par celle de la glycoprotéine rabique, de la glycoprotéine env du virus HIV et de la protéine F du virus de la rougeole.
25
7. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle le polypeptide immunogène est originaire d'une région précoce et/ou tardive d'un papillomavirus et, notamment d'un papillomavirus humain (HPV) de type 16, 18, 31, 33 ou 45.
30

8. Composition antitumorale selon la revendication 7, dans laquelle le polypeptide immunogène dérive d'un polypeptide de la région précoce d'un papillomavirus et, notamment de E6 ou E7.
- 5 9. Composition antitumorale selon la revendication 7, dans laquelle le polypeptide immunogène dérive d'un variant non oncogène dudit polypeptide E6 ou E7 d'un papillomavirus.
- 10 10. Composition antitumorale selon l'une des revendications 7 à 9, dans laquelle le polypeptide immunogène dérive du polypeptide L1 ou L2 d'un papillomavirus.
- 15 11. Composition antitumorale selon l'une des revendications 7 à 10, comprenant au moins un polypeptide immunogène dérivant d'un polypeptide précoce et au moins un polypeptide immunogène dérivant d'un polypeptide tardif d'un papillomavirus.
- 20 12. Composition antitumorale selon l'une des revendications 7 à 11, comprenant :
- (1) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1,
 - (2) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
 - (3) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1 et un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
 - 25 (4) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus,
 - 30 (5) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus, ou

- (6) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus.
- 5
13. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 12, comprenant en outre au moins un composé améliorant l'effet antitumoral de ladite composition.
- 10
14. Composition antitumorale selon la revendication 13, dans laquelle ledit composé est un immunostimulateur.
- 15
15. Composition antitumorale selon la revendication 14, dans laquelle ledit composé immunostimulateur est sélectionné parmi le groupe constitué par l'interleukine-2, l'interleukine-7, l'interleukine-12 et les molécules de co-adhésion B7.1 et B7.2.
- 20
16. Composition antitumorale qui comprend à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique au moins un vecteur recombinant comprenant les séquences codant pour un ou plusieurs polypeptide(s) immunogène(s), l'un au moins desdits polypeptides étant modifié de manière à présenter une localisation différente de sa localisation native et, éventuellement, pour un composé améliorant l'effet antitumoral de ladite composition.
- 25
17. Composition antitumorale selon la revendication 16, dans laquelle lesdits polypeptides immunogènes et améliorant l'effet antitumoral ont les caractéristiques telles que définies à l'une quelconque des revendications 1 à 15.
- 30
18. Composition antitumorale selon la revendication 16 ou 17, dans laquelle le vecteur recombinant dérive d'un poxvirus et notamment d'un virus de la vaccine, d'un canaripox et d'un fowlpox.

19. Composition antitumorale selon la revendication 18, dans laquelle le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine sélectionné parmi les souches Copenhague, Wyeth et Ankara modifiée (MVA).

5

20. Composition antitumorale selon la revendication 19, dans laquelle le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague et les séquences codant pour le ou lesdits polypeptides sont insérées au niveau du locus TK et/ou K1L dudit virus de la vaccine.

10

21. Composition antitumorale selon la revendication 19, dans laquelle le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine de la souche MVA et les séquences codant pour le ou lesdits polypeptides sont insérées au niveau de l'une au moins des zones d'excision I à VI dudit virus de la vaccine et, notamment II et/ou III.

15

22. Composition antitumorale selon l'une des revendications 18 à 21, dans laquelle les séquences codant pour le ou lesdits polypeptides sont placées sous le contrôle d'un promoteur d'un gène d'un virus de la vaccine et, notamment d'un promoteur sélectionné parmi les promoteurs des gènes thymidine kinase (TK), 7,5K, H5R et K1L.

20

23. Composition antitumorale selon l'une des revendications 16 à 22, destinée au traitement ou la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus, comprenant au moins un vecteur recombinant dérivé d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans lequel sont insérées :

25

(1) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1,

(2) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,

30

(3) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1 et pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,

- (4) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus,
- (5) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus, ou
- (6) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus.
24. Composition antitumorale selon la revendication 23, comprenant en outre les séquences codant pour un composé immunostimulateur, de préférence, choisi parmi L'IL-2 ou B7.1.
25. Composition antitumorale selon l'une des revendications 16 à 24, dans laquelle le vecteur recombinant est vivant ou tué.
26. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 25, comportant un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique permettant son administration par injection à l'homme ou à l'animal.
27. Utilisation d'une composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 26, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'un cancer ou d'une tumeur.

28. Utilisation selon la revendication 27, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'un cancer du col de l'utérus, d'une dysplasie du col de bas grade et d'une infection à papillomavirus.

ORIGINAL

CABINET REGIMBEAU
CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
26, Avenue Kleber
75146 PARIS

Revendications

1. Composition antitumorale comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un ou plusieurs polypeptide(s) immunogène(s), caractérisée en ce que l'un au moins desdits polypeptides est originaire d'une région précoce et/ou tardive d'un papillomavirus et, notamment d'un papillomavirus humain (HPV) de type 16, 18, 31, 33 ou 45, et est modifié de manière à présenter une localisation différente de sa localisation native.
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la modification du polypeptide est obtenue par l'introduction de signaux de localisation appropriés et/ou la délétion ou l'inactivation des signaux de localisation natifs.
3. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 ou 2, dans laquelle le polypeptide immunogène ayant naturellement une localisation non membranaire, notamment nucléaire, est modifié de manière à présenter une localisation membranaire.
4. Composition antitumorale selon la revendication 3, dans laquelle le polypeptide immunogène est modifié par insertion d'une séquence d'ancrage membranaire et, le cas échéant, d'une séquence de sécrétion.
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le polypeptide est délété de sa séquence de localisation nucléaire.
6. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 et 4, dans laquelle la séquence de sécrétion et/ou d'ancrage membranaire est sélectionnée parmi le groupe constitué par celle de la glycoprotéine rabique, de la glycoprotéine env du virus HIV et de la protéine F du virus de la rougeole.

7. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle le polypeptide immunogène dérive d'un polypeptide de la région précoce d'un papillomavirus et, notamment de E6 ou E7.
- 5 8. Composition antitumorale selon la revendication 7, dans laquelle le polypeptide immunogène dérive d'un variant non oncogène dudit polypeptide E6 ou E7 d'un papillomavirus.
9. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle le
10 polypeptide immunogène dérive du polypeptide L1 ou L2 d'un papillomavirus.
10. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 9, comprenant au moins un polypeptide immunogène dérivant d'un polypeptide précoce et au moins un polypeptide immunogène dérivant d'un polypeptide tardif d'un papillomavirus.
15
11. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 10, comprenant :
- (1) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1,
- (2) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à
20 tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- (3) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1 et un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- (4) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à
25 tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus,
- (5) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à
30 tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus, ou

- 5 (6) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus.
- 10 12. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 11, comprenant en outre au moins un composé améliorant l'effet antitumoral de ladite composition.
13. Composition antitumorale selon la revendication 12, dans laquelle ledit composé est un immunostimulateur.
- 15 14. Composition antitumorale selon la revendication 13, dans laquelle ledit composé immunostimulateur est sélectionné parmi le groupe constitué par l'interleukine-2, l'interleukine-7, l'interleukine-12 et les molécules de co-adhésion B7.1 et B7.2.
- 20 15. Composition antitumorale qui comprend à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique au moins un vecteur recombinant comprenant les séquences codant pour un ou plusieurs polypeptide(s) immunogène(s), l'un au moins desdits polypeptides étant originaire d'une région précoce et/ou tardive d'un papillomavirus et, notamment d'un papillomavirus humain (HPV) de type 16, 18, 31, 33 ou 45, et étant modifié de manière à présenter une localisation différente de sa localisation native et, éventuellement, pour un composé améliorant l'effet
- 25 antitumoral de ladite composition.
- 30 16. Composition antitumorale selon la revendication 15, dans laquelle lesdits polypeptides immunogènes et améliorant l'effet antitumoral ont les caractéristiques telles que définies à l'une quelconque des revendications 1 à 14.

17. Composition antitumorale selon la revendication 15 ou 16, dans laquelle le vecteur recombinant dérive d'un poxvirus et notamment d'un virus de la vaccine, d'un canaripox et d'un fowlpox.
- 5 18. Composition antitumorale selon la revendication 17, dans laquelle le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine sélectionné parmi les souches Copenhague, Wyeth et Ankara modifiée (MVA).
- 10 19. Composition antitumorale selon la revendication 18, dans laquelle le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague et les séquences codant pour le ou lesdits polypeptides sont insérées au niveau du locus TK et/ou K1L dudit virus de la vaccine.
- 15 20. Composition antitumorale selon la revendication 19, dans laquelle le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine de la souche MVA et les séquences codant pour le ou lesdits polypeptides sont insérées au niveau de l'une au moins des zones d'excision I à VI dudit virus de la vaccine et, notamment II et/ou III.
- 20 21. Composition antitumorale selon l'une des revendications 17 à 20, dans laquelle les séquences codant pour le ou lesdits polypeptides sont placées sous le contrôle d'un promoteur d'un gène d'un virus de la vaccine et, notamment d'un promoteur sélectionné parmi les promoteurs des gènes thymidine kinase (TK), 7,5K, H5R et K1L.
- 25 22. Composition antitumorale selon l'une des revendications 15 à 21, destinée au traitement ou la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus, comprenant au moins un vecteur recombinant dérivé d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans lequel sont insérées :
- 30 (1) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1,

D ocuments reçus
le : 23 . 07 - 98
Non examinés par
l'I.N.P.I.

- (2) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- 5 (3) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1 et pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- 10 (4) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus,
- 15 (5) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus, ou
- 20 (6) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus.
- 25
23. Composition antitumorale selon la revendication 22, comprenant en outre les séquences codant pour un composé immunostimulateur, de préférence, choisi parmi L'IL-2 ou B7.1.
- 30 24. Composition antitumorale selon l'une des revendications 15 à 23, dans laquelle le vecteur recombinant est vivant ou tué.

D ocuments reçus
le : 23-07-98
Non examinés par
l'I.N.P.I.

25. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 24, comportant un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique permettant son administration par injection à l'homme ou à l'animal.
- 5 26. Utilisation d'une composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 25, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'un cancer ou d'une tumeur.
- 10 27. Utilisation selon la revendication 26, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'un cancer du col de l'utérus, d'une dysplasie du col de bas grade et d'une infection à papillomavirus.

THIS PAGE BLANK (USPTO)